Coffret SPOT-Light® HER2 CISH

IVD

REF **Référence catalogue 84-0150**

Σ **20 tests utilisant des lamelles de 24 mm x 30 mm**

CE

Utilisation prévue

IVD

Réservé à l'usage pour diagnostics *in vitro*

Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH est destiné au dosage quantitatif de l'amplification du gène HER2 sur des coupes de tissus de cancer du sein inclus dans la paraffine et fixés au formol (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) par hybridation chromogénique in situ (chromogenic in situ hybridization, CISH) et microscopie en champ clair. Le test doit être effectué dans un laboratoire d'histopathologie.

Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH est indiqué comme aide dans l'évaluation des patientes pour lesquelles un traitement à base d'Herceptin® (trastuzumab) est envisagé. Les résultats du test sont destinés à être utilisés en complément des informations clinicopathologiques utilisées dans le cadre de la prise en charge des patientes atteintes du cancer du sein. Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des antécédents cliniques de la patiente par un pathologiste agréé.

Résumé et description du test

Le gène humain HER2 ou c-*erb*B-2, et le gène équivalent du rat, *neu*, ont été identifiés comme des proto-oncogènes[1-3] homologues de l'oncogène v-*erb*B qui leur est étroitement apparenté.[1] Le gène HER2 est situé sur le chromosome 17 (17q11.2-21) et code une protéine membranaire de 185 kDa de type récepteur. La protéine HER2 possède une activité tyrosine kinase et partage une relative homologie avec le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (connu sous les noms de EGFr, HER1ou c-*erb*B-1).[2]

L'amplification du gène HER2 ou la surexpression de la protéine HER2 a été identifiée dans 18 à 30 % des cancers du sein humains.[8-9] L'identification du statut d'amplification du gène HER2 est cruciale pour établir le pronostic des patientes diagnostiquées avec un cancer du sein invasif, ainsi que pour sélectionner les patientes éligibles à une thérapie au trastuzumab (Herceptin®, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suisse et Genentech, Inc., South San Francisco, CA).[4-6] Le trastuzumab est un anticorps monoclonal spécifique à la protéine HER2. Le trastuzumab s'avère être un traitement efficace uniquement chez les patientes dont les tumeurs présentent une amplification du gène HER2 et/ou une surexpression de la protéine HER2.[7,11] Dans les cancers du sein précoces, une brève cure de trastuzumab administrée en même temps que du docétaxel ou du vinorelbine a donné de bons résultats chez les femmes atteintes d'un cancer du sein avec une amplification du gène *HER2/neu*.[12] D'autres études ont également montré que le statut HER2 permettait d'anticiper la sensibilité ou la résistance à certaines chimiothérapies.[13] Par conséquent, des méthodes précises, fiables et directes pour l'évaluation du statut du gène HER2 et de la protéine HER2 ont acquis une importance croissante.

Principes de la procédure

La technique CISH utilise des sondes à ADN marquées à la digoxigénine spécifiques du locus du gène HER2 sur le chromosome 17q11.2-21 pour l'hybridation avec les acides nucléiques complémentaires présents dans l'échantillon de cancer du sein. La sonde HER2 marquée a été mise au point à l'aide de la technologie propriétaire et brevetée Subtraction Probe Technology (SPT™) qui permet de créer des sondes spécifiques en réduisant de manière significative les séquences répétitives (par exemple, éléments Alu et LINE) présentes dans les acides nucléiques humains. Il a été démontré par méthode PCR que la sonde contient le gène HER2 et par la méthode FISH sur métaphase sur des lymphocytes normaux qu'elle se lie spécifiquement au locus du gène HER2 sur le chromosome 17q11.2-21. Par conséquent, les sondes SPT™ d'Invitrogen sont spécifiques par nature et ne requièrent pas de bocage des séquences répétitives comme cela est nécessaire pour les sondes ADN cytogénétiques traditionnelles. La technique CISH permet d'évaluer les aberrations génétiques sous un microscope en champ clair par détection chromogénique.

Les résultats de la coloration CISH peuvent être visualisés avec netteté à l'aide d'un microscope en champ clair standard et d'un objectif à sec de 40X. Le statut d'amplification du gène HER2 peut être visualisé dans le contexte de la morphologie des tissus environnants.

Après le déparaffinage, les échantillons sont soumis à un prétraitement consistant en une phase de restauration par la chaleur suivie d'une phase de digestion enzymatique. Les spécimens sont ensuite déshydratés et séchés à l'air avant l'ajout de la sonde HER2. Après l'ajout de la sonde et la pose de la lamelle protectrice sur l'échantillon, celui-ci est dénaturé et hybridé pendant plus de 10 heures ou durant toute une nuit. L'échantillon est ensuite lavé pour éliminer la sonde non hybridée et le signal est détecté de manière chromogénique par l'ajout séquentiel d'un anticorps dirigé contre la digoxigénine puis du conjugué HRP (polymère conjugué à de la peroxydase). La coloration est produite par la liaison de HRP avec le chromogène DAB en présence du substrat H_2O_2. L'échantillon est enfin contre coloré avec l'hématoxyline de Mayer afin d'identifier la morphologie du tissu et recouvert par une lamelle protectrice. Un point brun foncé unique signale la présence en faible quantité du gène HER2 ; des agrégats bruns signalent la présence du gène en grand nombre de copies. Les zones des cellules tumorales peuvent être facilement localisées sous un objectif à faible puissance d'un microscope en champ clair et les copies du gène HER2 peuvent être quantifiées à l'aide d'un objectif de 40X. Le microscope en champ clair doté d'un objectif de 40X permet de localiser les cellules tumorales et de quantifier les copies du gène HER2. Le DAB forme un précipité coloré permettant d'archiver les résultats et de les consulter ultérieurement.

Composants fournis

Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH contient l'ensemble des réactifs requis pour effectuer la procédure CISH sur des tissus inclus dans la paraffine et fixés au formol. Les composants indiqués ci-dessous permettent d'effectuer 20 tests et jusqu'à 2 séries avec les deux lames de contrôle, en utilisant des échantillons de tissu montés sous des lamelles de 24 mm x 30 mm. La plupart des tests peuvent être effectués avec des lamelles protectrices plus petites.

Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH est livré sur des blocs réfrigérants. Les blocs réfrigérants doivent être encore froids à la réception du coffret pour garantir que le matériel n'a pas été exposé à des températures élevées. Certains composants peuvent cependant rester dégelés sans que cela affecte les performances du coffret. Veuillez consulter les recommandations de **stockage des réactifs** pour les ranger immédiatement après leur réception.

Réactif A. **Solution de prétraitement par la chaleur**
1 l contenant le tampon Tris-EDTA (prêt à l'emploi)

Réactif B. **Réactif de prétraitement enzymatique**
5 ml contenant une solution de pepsine avec 0,05 % d'azide de sodium et de détergent (prêt à l'emploi)
ATTENTION : dangereux

Réactif C. **Sonde HER2**
0,4 ml de sonde SPOT-Light® HER2 marquée à la digoxigénine dans un tampon d'hybridation contenant du formamide (prêt à l'emploi)
ATTENTION : dangereux

Réactif D. **Tampon SSC**
500 ml, contenant du SSC (saline sodium citrate) (prêt à l'emploi)

Réactif E1. **Poudre PBS**
3 sachets, chacun suffisant pour 1 l de PBS

Réactif E2. Tween 20 (50 %)
2 ml, Tween 20 dans une solution à 50 %

Réactif F. CAS-Block™
3 ml de tampon, avec un stabilisateur et 0,1 % d'azide de sodium (prêt à l'emploi)
ATTENTION : dangereux

Réactif G. Anticorps de souris anti-digoxigénine
3 ml de tampon, contenant de la BSA avec un stabilisateur et 0,1 % d'azide de sodium (prêt à l'emploi)
ATTENTION : dangereux

Réactif H. Anticorps de chèvre anti-souris polymère conjugué à de la peroxydase
3 ml de tampon, contenant un stabilisateur, 0,005 % de sulfate de gentamicine et 0,1 % de Proclin 300 (prêt à l'emploi)

Réactif I1. Tampon substrat DAB (20x)
1 ml de tampon concentré

Réactif I2. Solution DAB, (20x)
1 ml de concentré contenant 85 % m/v de méthanol
ATTENTION : inflammable et toxique

Réactif I3. Peroxyde d'hydrogène (20x)
1 ml, H_2O_2 à 0,6 %

Réactif J. Hématoxyline de Mayer
100 ml (prêt à l'emploi)

Réactif K. Solution de fixation Histomount™
4 ml (prêt à l'emploi)
ATTENTION : hautement inflammable et dangereux

Lame de contrôle L. Lames de cellules de contrôle procédurales
2 lames, chacune avec 2 lignées cellulaires fixées au formol et incluses dans de la paraffine (FFPE) juxtaposées :
A) *HER2* non amplifié (MCF-7) et
B) *HER2* amplifié (SK-OV-3)
[Une lignée cellulaire non amplifiée avec des résultats quantifiables est recommandée pour un contrôle optimal du dosage.]

RÉACTIFS/COMPOSANTS ET ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES, MAIS NON FOURNIS

Autres réactifs/composants	Référence catalogue Invitrogen
1. Lames SuperFrost Plus **OU** Lames adhésives Histogrip™	00-8050
2. Contrôle de tissu positif : coupe de tissu cancéreux du sein FFPE (canalaire, tubulaire, lobulaire ou de type mixte) avec amplification du gène *HER2* confirmée au préalable par CISH ou FISH	
3. Contrôle de tissu négatif : coupe de tissu cancéreux du sein FFPE (canalaire, tubulaire, lobulaire ou de type mixte) avec non amplification du gène *HER2* confirmée au préalable par CISH ou FISH	
4. Eau désionisée ou distillée (H_2Od)	
5. Xylène	
6. Éthanol (EtOH) 70 %, 85 %, 95 % et 100 %	
7. Lamelles, colle caoutchouc, aiguille 18G ½ po et seringue de 5 ml **OU**	
8. Dispositifs UnderCover™ Slips (18 x 18 mm)	00-8403
9. Dispositifs UnderCover™ Slips (22 x 22 mm)	00-8404
10. 30 % peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	
11. Méthanol absolu	

Équipement

1. Minuterie
2. Pipette (20 µl, 1000 µl)
3. Embouts de pipette
4. Grille
5. Plaque chauffante, feuille d'aluminium et bécher d'1 l
6. Platine chauffante pour lames
7. Incubateur 37°C
8. Thermocycleur PCR avec bloc de lames **OU**
   Bloc chauffant avec thermomètre numérique et incubateur 37°C (± 1°C) et chambre de simulation d'humidité pour lames
9. Bain-marie (capable de maintenir une température comprise entre 70 et 80°C) avec un thermomètre étalonné
10. Jarres Coplin et jarres de coloration
11. Microscope en champ clair avec des objectifs de 20X et de 40X

Précautions

- Destiné au diagnostic *in vitro*
- Réservé aux utilisateurs professionnels qualifiés.
- Utiliser le coffret **avant** la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Si le produit est stocké dans des conditions autres que celles indiquées sur la notice, ces conditions de stockage doivent être vérifiées par l'utilisateur.
- Ne pas manger, boire, fumer ou utiliser de produits cosmétiques sur le lieu de manipulation des composants du coffret. Les bonnes pratiques de laboratoire internationales doivent être observées.
- Aucune méthode de test ne peut apporter une garantie absolue quant à l'absence de tout risque biologique. Manipuler le matériel selon le niveau de sécurité 2, de la même façon que tout matériel humain potentiellement infectieux tel que recommandé par le Centers for Disease Control/National Institutes for Health dans le manuel « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », 4ème édition, avril 1999.
- Ne pas pipeter les réactifs avec la bouche et éviter tout contact des spécimens et des réactifs avec la peau et les muqueuses. En cas de contact avec la bouche ou les muqueuses, rincer abondamment les zones concernées avec de l'eau.
- Les réactifs B, F et G contiennent 0,1 % d'azide de sodium, le réactif H contient 0,005 % de sulfate de gentamicine et 0,1 % de Proclin, le réactif I2 contient 85 % m/v de méthanol et le réactif I3 contient 0,6 % de peroxyde d'hydrogène. Ces réactifs, aux concentrations présentes dans le produit, ne nécessitent pas d'être étiquetés comme produits dangereux. Se reporter à la fiche technique de sécurité du composant pour plus d'informations.
- Le réactif B contient de la pepsine ; une enzyme susceptible de provoquer des réactions allergiques en cas de contact avec la peau.
- Utiliser un bain-marie, un bloc chauffant et un four à hybridation étalonnés en température pour des résultats optimum.
- Certains réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium comme agent de conservation. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb ou le cuivre des tuyauteries et former des azides métalliques explosifs, notamment si une accumulation se produit. Lors de l'élimination des réactifs contenant de l'azide de sodium, rincer abondamment avec de l'eau pour éviter tout risque chimique dans les tuyauteries.
- Certains réactifs de ce coffret contiennent du Proclin, de l'azide de sodium ou du peroxyde d'hydrogène. Ces réactifs sont classés comme dangereux car ils provoquent des irritations cutanées et au niveau des muqueuses. Ces substances sont fournies sous forme diluée dans ce coffret réduisant ainsi de manière significative mais pas absolue les risques d'exposition. Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les vêtements. Se reporter à la fiche technique de sécurité du composant pour plus d'informations.
- Le 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) peut être dangereux s'il est ingurgité, inhalé ou absorbé au niveau cutané. Il peut également provoquer des irritations au niveau des yeux, de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires supérieures. Le DAB est considéré comme potentiellement carcinogène. Consulter les réglementations fédérales, nationales et/ou locales pour plus d'informations sur les recommandations pour l'élimination.
- Éviter toute évaporation du réactif I2. Le méthanol est volatile. Prendre les mesures appropriées pour éviter toute évaporation, comme le scellement du conteneur et l'abaissement du couvercle immédiatement après utilisation. L'évaporation du méthanol peut entraîner la formation d'un précipité de DAB pouvant affecter les résultats du marquage.

- Éviter toute évaporation pendant l'hybridation en garantissant que les lames sont correctement scellées et que le taux d'humidité de la chambre d'hybridation est approprié.
- Le prétraitement enzymatique peut varier selon la fixation et l'épaisseur du tissu. Pour la plupart des coupes de tissu (4 à 5 µm) fixés avec une solution tamponnée neutre de formol à 10 %, le prétraitement enzymatique ne doit pas dépasser 5 minutes. Avec les tissus pour lesquels aucune donnée de fixation n'est disponible, un titrage enzymatique (par exemple, 2 min, 5 min et 10 min) doit être effectué avec un délai de digestion maximum ajusté par rapport aux résultats initiaux.
- **Réactif C** – Sonde marquée HER2 contenant du formamide classé comme dangereux.
  R21 – Dangereux au contact de la peau
  R22 – Dangereux en cas d'ingestion
  R61 – Présente un risque pour le fœtus
  S24 – Éviter tout contact avec la peau
  S36 – Porter des gants de protection appropriés
  S37 – Porter des gants appropriés
  S39 – Porter une protection oculaire/faciale
- **Réactif I2** – Solution de DAB contenant du méthanol classé comme inflammable et toxique. Se reporter à la fiche technique de sécurité du composant pour plus d'informations.
  R10 – Inflammable
  R23/24/25 – Toxique en cas d'inhalation, d'ingestion ou au contact de la peau
  S45 – En cas d'accident, contacter immédiatement votre médecin si vous ressentez un malaise
  S36 – Porter des gants de protection appropriés
  S37 – Porter des gants appropriés
- **Réactif K** – Solution de fixation Histomount contenant du toluène classé comme hautement inflammable et dangereux en cas d'inhalation. Se reporter à la fiche technique de sécurité du composant pour plus d'informations.
  R11 – Hautement inflammable
  R20 – Dangereux en cas d'inhalation
  S2 – Tenir hors de portée des enfants
  S16 – Tenir à distance des sources d'inflammation – Interdiction de fumer
  S25 – Éviter tout contact avec les yeux
  S29 – Ne pas déverser dans les égouts
  S33 – Prendre des mesures de précaution contre les décharges statiques
- Tous les réactifs énumérés sont prêts à l'emploi et possèdent une dilution optimale. Une dilution supplémentaire risque de fausser les résultats du dosage.
- Les temps d'incubation, les réactifs et les températures sont optimisés. L'utilisation de temps d'incubation, de réactifs ou de températures autres risque de fausser les résultats du dosage.
- L'utilisation de fixateurs ou d'épaisseurs de tissu différents n'est pas recommandée et risque de fausser les résultats du test.
- Se reporter aux réglementations locales relatives à l'élimination des composants potentiellement toxiques.
- Limiter la contamination microbienne pour éviter toute coloration non spécifique.
- Multiplier les précautions lors de la manipulation des réactifs. Porter des gants, une blouse et lunettes jetables lors de la manipulation de matières potentiellement carcinogènes.

Stockage des réactifs

- Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH doit être stocké entre 2 et 8°C.
- Conserver le **réactif J** à température ambiante (entre 15 et 30°C).
  Remarque : les performances du **réactif B** peuvent être altérées en cas d'exposition à des températures élevées. Conserver ce réactif entre 2 et 8°C immédiatement après utilisation. Ne pas conserver ce réactif à température ambiante.
- Conserver le tampon PBS Tween 20 en cours d'utilisation à température ambiante (15 à 30°C) jusqu'à 1 semaine au maximum.

> Ne pas utiliser le coffret après la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Si le produit est stocké dans des conditions autres que celles indiquées sur la notice, ces conditions de stockage doivent être vérifiées par l'utilisateur. Inspecter les lames de contrôle car aucun signe apparent n'indique l'instabilité du produit. Contacter le service d'assistance technique si vous suspectez un problème au niveau du coffret.

Mode d'emploi

A. Préparation du spécimen

Coupes de tissu inclus dans la paraffine **:**

- Les tissus fixés dans du formol tamponné neutre pendant 6 à 48 heures avant l'incorporation dans la paraffine peuvent être utilisés.
- Les fixateurs autres que le formol tamponné neutre à 10 % n'ont pas été optimisés pour ce protocole et ne doivent pas être utilisés.
- Les coupes de tissu (4 à 5 µm d'épaisseur) doivent être fixés sur des lames de microscope HistoGrip™ traitées ou Superfrost Plus. Dans la mesure du possible, utiliser des coupes de tissu possédant l'épaisseur normalisée pour garantir une coloration uniforme des réactifs de coloration de contraste et de détection CISH.[28]
- Laisser les lames sécher à l'air ou les sécher à 37°C puis les passer au four pendant 2 à 4 heures à 60°C.
- Les tissus fixés et incorporés de façon appropriée se conserveront de façon illimitée avant leur sectionnement et leur installation sur des lames s'ils sont conservés dans un endroit frais et sec (entre 15 et 30°C).[26,27]
- Les coupes de tissu de 2 à 3 µm d'épaisseur risquent de donner des résultats de copie de gène faussement bas.

B. Procédure CISH standard pour les coupes de tissu FFPE

Notes relatives à la procédure

- Tous les réactifs à l'exception du **réactif C** (sonde HER2) doivent être portés à température ambiante (entre 15 et 30°C) avant utilisation. La sonde HER2 doit être utilisée à basse température sans être équilibrée à température ambiante. Chaque incubation doit être effectuée à température ambiante (entre 15 et 30°C), sauf indication contraire.

- Au cours de la procédure et sauf indication contraire, veiller à garder les coupes de tissu humide entre chacune des étapes.

- Plusieurs lavages seront effectués pendant la procédure. Renouveler la solution pour chaque lavage.

- Les **lames de contrôle** doivent être traitées en même temps que les échantillons du test de la patiente et subir un traitement identique à chaque étape.

- Sauf indication contraire, toutes les étapes sont effectuées à température ambiante (15 à 30°C).

- Cette procédure s'étend sur plus de huit heures. Un découpage pratique est indiqué ci-dessous sur deux jours. Le premier jour décrit les étapes de **déparaffinage** jusqu'à la **dénaturation et l'hybridation** (pendant la nuit) et les étapes comprenant le **lavage stringent** jusqu'à la **lecture au moyen d'un microscope en champ clair** ont lieu le deuxième jour.

- Les réactifs Invitrogen fournis avec le coffret sont indispensables pour la procédure CISH. L'utilisation de réactifs de lots différents risque de créer des bruits de fond élevés ou d'entraîner une diminution ou la perte du signal CISH. La substitution de l'un des réactifs fournis dans le coffret peut invalider les résultats du test.

Procédure du jour 1

1. **Préparation du réactif**
   - **Xylène** (2 conteneurs de lames)**, éthanol absolu** (3 conteneurs de lames)
     - Recouvrir complètement et conserver jusqu'à 1 semaine à température ambiante (entre 15 et 30°C) ou jusqu'au traitement de la 100e lame.

   - **Gradients de concentration d'éthanol (EtOH)**

- Préparer plusieurs bains avec de l'éthanol à 70 %, à 85 %, à 95 % et à 100 %.
- Recouvrir complètement et conserver jusqu'à 1 semaine à température ambiante (entre 15 et 30°C) ou jusqu'au traitement de la 100e lame.

Étiqueter chaque réactif de lavage de façon appropriée et consigner et conserver l'ordre d'utilisation pendant la procédure.

2. Déparaffinage

Remarque : préparer les réactifs en quantité suffisante pour chaque conteneur de lames à utiliser pour le nombre de lames de la série. Chaque lavage nécessite un volume spécifique de réactif. Si l'étape suivante est décalée, laisser sécher les lames à l'air après les avoir trempées trois fois dans de l'éthanol absolu, au lieu de les laver dans de l'H_2Od à trois reprises.

a) Plonger deux fois dans du xylène pendant 5 min chaque fois
b) Tremper trois fois dans de l'éthanol absolu pendant 3 min chaque fois
c) Laver trois fois dans de l'H_2Od pendant 2 min chaque fois

Effectuer le déparaffinage si nécessaire pour obtenir des résultats optimum et reproductibles.

3. Prétraitement par la chaleur

Remarque : les lames doivent être portées à ébullition et chauffées à une température ≥ 98°C pendant 15 min dans la solution de prétraitement par la chaleur (**réactif A**). Vérifier que la température est comprise entre 98°C et 100°C pour éviter de surchauffer les lames. Il est recommandé d'utiliser la plaque chauffante lors de cette étape (pour les protocoles utilisant un autocuiseur avec un indicateur de pression et de température ou un four à micro-ondes doté d'un indicateur des températures, veuillez contacter le service d'assistance technique d'Invitrogen à l'adresse suivante : techsupport@invitrogen.com). La solution de prétraitement par la chaleur (**réactif A**) peut être utilisée deux fois avant d'être jetée.

a) Placer les lames sur la grille.
b) Chauffer la solution de prétraitement par la chaleur (**réactif A**) dans un bécher placé sur une plaque chauffante jusqu'à l'obtention d'une ébullition constante et d'une température ≥ 98°C. Pour éviter l'évaporation du tampon, recouvrir le bécher d'un couvercle en verre ou d'une feuille d'aluminium.
c) Placer les lames dans la solution en ébullition, couvrir le bécher, commencer le compte à rebours lorsque la température atteint 98°C ou lorsque les bulles d'ébullition réapparaissent et porter à ébullition pendant 15 min. Vérifier que la température reste comprise entre 98°C et 100° C.
d) Mettre immédiatement les lames dans de l'H_2Od à température ambiante (entre 15 et 30°C).
e) Laver trois fois dans de l'H_2Od pendant 2 min chaque fois.

4. Digestion enzymatique

Remarque : pour la plupart des tissus mammaires, une digestion enzymatique de 5 min à température ambiante (entre 15 et 30°C) fournira des résultats CISH optimum. Le temps de digestion doit être ajusté en fonction des premiers résultats obtenus à l'issue du temps de digestion de 5 min. Un temps d'incubation enzymatique différent peut être requis selon la méthode de fixation et l'épaisseur du tissu. D'après une étude spécifique, le temps de digestion enzymatique peut varier de 2 à 20 min et fournir un signal CISH correct pour l'évaluation HER2 dans un ensemble d'échantillons de tissus mammaires archivés. Une étude de concordance destinée à promouvoir l'utilisation de la technique CISH par rapport à la technique FISH a montré que pour les échantillons de tissus cancéreux du sein cliniques utilisés et traités au cours des 12 mois de l'étude, le temps de digestion enzymatique de 5 min fournissait des signaux CISH optimum pour la quantification du gène HER2.[28]

a) Équilibrer le réactif de prétraitement enzymatique (**réactif B**) à température ambiante (entre 15 et 30°C).
b) Ajouter suffisamment de **réactif B** pour recouvrir la coupe de tissu et incuber pendant 5 min à température ambiante (entre 15 et 30°C).
c) Laver trois fois dans de l'H_2Od pendant 2 min chaque fois

5. Déshydratation dans des concentrations croissantes d'éthanol :

a) Éthanol à 70 % pendant 2 min.
b) Éthanol à 85 % pendant 2 min.
c) Éthanol à 95 % pendant 2 min.
d) Éthanol absolu pendant 2 min.
e) Éthanol absolu pendant 2 min.

6. **Sécher les lames à l'air libre pendant ≥ 20 min ou jusqu'à leur séchage complet.** Étiqueter les lames à l'aide d'un crayon si nécessaire.

7. **Dénaturation et hybridation**

Remarque: utiliser un thermocycleur PCR avec le bloc de lames ou un bloc chauffant à affichage digital de la température et une chambre de simulation d'humidité pour lames avec un incubateur à 37°C ou un appareil comparable. Vérifier que le taux d'humidité des chambres est approprié. L'hybridation effectuée sur des périodes plus courtes peut créer un signal plus faible. La dénaturation de la sonde à une température inférieure à celle recommandée par le protocole risque de créer un signal CISH faible ou d'annuler tout signal. La modification des temps d'incubation peut générer un signal faible ou une coloration de fond.

a) Ajouter 15 µl de sonde HER2 (**réactif C**) au milieu du couvre-lame de 22 x 22 mm. Selon la taille du tissu, la quantité de sonde requise peut varier. Utiliser les volumes de sonde suivants en fonction de la taille de la lamelle :
   - 18 mm x 18 mm 10 µl
   - 22 mm x 22 mm 15 µl
   - 24 mm x 30 mm 20 µl

b) Placer la lamelle, la sonde face vers le bas, sur la zone appropriée d'échantillon de tissu se trouvant sur la lame. Les dispositifs UnderCover™ Slips CISH d'Invitrogen peuvent être utilisées à la place des lamelles standard. Lors de l'utilisation de dispositifs UnderCover™ Slips CISH, tirer le papier vers l'arrière et placer la face possédant la lamelle exposée (face où le papier vient d'être retiré) sur la zone appropriée de la lame afin de recouvrir l'échantillon de tissu. Appuyer sur les bords de bande pour sceller la lamelle afin d'éviter toute évaporation. NE PAS APPUYER AU MILIEU DE LA LAMELLE.

c) Lors de l'utilisation d'une lamelle standard, celle-ci doit être scellée pour éviter toute évaporation pendant l'incubation. Le scellement peut être réalisé à l'aide d'une seringue de 5 ml et d'une aiguille de 18G ½ po. Remplir la seringue de colle caoutchouc et l'appliquer en fine couche sur les bords de la lamelle en dépassant légèrement sur la lame.

d) Laisser sécher la colle caoutchouc (10 min environ) pour éviter tout glissement de la lamelle.

e) La dénaturation et l'hybridation peuvent être effectuées au moyen d'un thermocycleur PCR en utilisant un bloc de lames ou un bloc chauffant doté d'un affichage digital de la température ainsi que d'une chambre de simulation d'humidité pour lames et un incubateur à 37°C.
   1) Lors de l'utilisation d'un thermocycleur PCR avec un bloc de lames, dénaturer à 95°C (± 1°C) pendant 5 min, puis laisser incuber toute la nuit (entre 10 et 18 h) à 37°C (±1°C).
   2) Lors de l'utilisation d'un bloc chauffant et d'une chambre de simulation d'humidité avec un incubateur à 37°C, dénaturer à 95°C (± 1°C) pendant 5 min, puis laisser incuber toute la nuit (entre 10 et 18 h) à 37°C (±1°C) dans une chambre de simulation d'humidité.

Procédure du jour 2

8. **Préparation du réactif**

- **PBS (tampon phosphate salin)**
  - Verser 1 paquet de PBS en poudre (**réactif E1**) dans 1 l de H_2Od. Mélanger.
- **Tampon PBS/Tween 20 tampon (Tween à 0,01 %)**
  - Ajouter 10 gouttes de Tween 20 à 50 % (**réactif E2**) dans 1 l de PBS (extrait du mélange ci-dessus). Mélanger.
  - Conserver à température ambiante (entre 15 et 30°C) jusqu'à 1 semaine.
- **Solution substrat chromogène (DAB)**
  - Préparer cette solution **immédiatement avant utilisation**.
  - Ajouter 1 goutte de chaque réactif (**I1, I2, I3**) dans 1 ml de H_2Od. Mélanger soigneusement.
- **H_2O_2 à 3 % dans du méthanol absolu**
  - Ajouter 1 volume de H_2O_2 à 30 % à 9 volumes de méthanol.
  - Recouvrir complètement et conserver jusqu'à 1 semaine à température ambiante (entre 15 et 30°C) ou jusqu'au traitement de la 100e lame.
- **Xylène** (2 grilles)
  - Recouvrir complètement et conserver jusqu'à 1 semaine à température ambiante (entre 15 et 30°C) ou jusqu'au traitement de la 100e lame.

9. **Lavage stringent**

Remarque : l'utilisation de températures plus élevées que celles recommandées par la procédure peut entraîner une diminution ou une perte totale du signal CISH. Les lavages effectués à une température trop basse peuvent générer des bruits de fond élevés. Un thermomètre étalonné doit être utilisé pour garantir que la température appropriée du bain-marie est atteinte et stabilisée.

a) Allumer le bain-marie à 70°C (±1°C) et l'amener à la température voulue.
b) Préparer deux jarres Coplin avec du tampon SSC (**réactif D**), une à température ambiante et l'autre chauffée à 70°C.
c) Retirer la colle caoutchouc ou le dispositif UnderCover™ Slip. **Ne pas laisser sécher la coupe de tissu**.
d) Pour retirer la lamelle sans déchirer le tissu, humidifier les lames au préalable dans le SSC à température ambiante pendant 2 à 3 min jusqu'à ce que les lamelles se décollent facilement. Passer ensuite à l'étape suivante.
e) Rincer rapidement les lames dans la jarre contenant le SSC à température ambiante (entre 15 et 30°C), puis immerger les lames pendant 5 min dans la jarre Coplin contenant le SSC dans le bain-marie à 70°C (±1°C).
f) Laver les lames trois fois dans de l'H_2Od pendant 2 min chaque fois

10. Immunodétection

a) Immerger les lames dans du H_2O_2 à 3 % dans du méthanol absolu pendant 10 min.
b) Laver trois fois dans du PBS/Tween 20 (0,01 %) pendant 2 min à chaque fois.
c) Ajouter 2 à 3 gouttes de CAS-Block™ (**réactif F**) par lame ou en quantité suffisante de sorte à recouvrir le tissu et laisser incuber pendant 10 min à température ambiante (entre 15 et 30°C).
d) Absorber **le réactif F** à l'aide de papier buvard. Ne pas rincer.
e) Ajouter 2 à 3 gouttes d'anticorps anti-digoxigénine de souris (**réactif G**) par lame ou en quantité suffisante pour recouvrir le tissu et laisser incuber pendant 30 min à température ambiante (entre 15 et 30°C).
f) Laver trois fois dans du PBS/Tween 20 (0,01 %) pendant 2 min chaque fois.
g) Ajouter 2 à 3 gouttes d'anticorps de chèvre anti-souris conjugué polymère HRP (**réactif H**) par lame ou en quantité suffisante pour recouvrir le tissu et laisser incuber pendant 30 min à température ambiante (entre 15 et 30°C) dans une chambre d'humidité.
h) Laver trois fois dans du PBS/Tween 20 (0,01 %) pendant 2 min chaque fois.
i) Pendant le lavage, préparer la solution substrat chromogène (DAB) et ajouter une goutte de chaque réactif (**I1, I2 et I3**) dans 1 ml d'H_2Od.
j) Ajouter 2 à 3 gouttes de substrat chromogène (DAB) par lame ou en quantité suffisante pour recouvrir le tissu et laisser incuber pendant 30 min. à température ambiante (entre 15 et 30°C) dans une chambre d'humidité.
k) Placer les lames sur la grille.
l) Laver sous l'eau du robinet pendant 2 min.

11. Coloration de contraste et montage

Remarque : réaliser une brève contre-coloration pendant 3 à 5 s et examiner le tissu à l'aide du microscope sans utiliser de lamelle. Réaliser une nouvelle coloration de contraste pendant 3 à 5 s pour obtenir une coloration nucléaire plus prononcée. Le temps de coloration de contraste dépend des tissus utilisés. Une coloration de contraste sombre est déconseillée car elle risque d'obscurcir les signaux de coloration positifs.

a) Réaliser une contre-coloration en utilisant de hématoxyline (**réactif J**) : 3 à 5 s.
b) Laver sous l'eau du robinet pendant 2 min.
c) Déshydrater dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes pendant 2 min dans chaque concentration (70 %, 85 %, 95 %, 100 %, 100 %, conservées suite au jour 1 et utilisées en respectant le même ordre).
d) Immerger deux fois dans du xylène pendant 2 min chaque fois. Ce bain de xylène **doit être** différent de celui utilisé le jour 1. Il peut être réutilisé pour cette étape pendant 1 semaine ou pour 100 lames au maximum.
e) Placer une lamelle à l'aide de la solution de fixation Histomount™ (**réactif K**).
f) Conserver les lames à température ambiante (entre 15 et 30°C) pour effectuer une analyse ultérieure des résultats.

Limites de la procédure

- Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH peut ne pas détecter les 5 %[10] de cancers du sein positifs par immunohistochimie (IHC) mais négatifs au test d'amplification du gène HER2.

- La technique CISH est une procédure à plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée à l'utilisation des réactifs appropriés, la sélection des tissus, la fixation, la manipulation, la préparation des lames CISH et à l'interprétation des résultats du marquage.
- Le marquage des tissus dépend du traitement et de la manipulation de l'échantillon de tissu avant l'étape de marquage. Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre l'interprétation des résultats.
- Toute déviation par rapport à la procédure de test recommandée peut invalider les résultats escomptés déclarés. Des méthodes de contrôle appropriées doivent être utilisées et documentées. Les utilisateurs s'écartant de la procédure de test recommandée assument alors la responsabilité de l'interprétation des résultats de spécimens.
- Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH a été optimisé uniquement pour identifier et quantifier le gène HER2/neu dans les spécimens de tissu de cancer du sein humain dans des noyaux en interphase fixés au formol et inclus dans la paraffine. Aucun autre type d'échantillon ou de fixateur n'a été validé.
- L'interprétation clinique de tous résultats de test doit être évaluée dans le cadre des antécédents médicaux de la patiente et d'autres tests de diagnostic.

Contrôle de la qualité

Contrôle positif et négatif sur une même lame

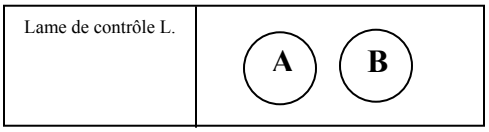


Image 1. La lame de contrôle L possède une lignée cellulaire non amplifiée A (MCF-7) et une lignée cellulaire amplifiée B (SK-OV-3). Remarque : les lignées cellulaires ne sont pas mises à l'échelle et sont en réalité plus petites que sur le schéma.

- Le signal CISH doit être brun, distinct et facile à évaluer.
- Les lames de contrôle incluses **(lame L**) possèdent deux coupes de 4 µm prélevés sur des blocs de cellules FFPE préparés à partir de deux lignées de cellules différentes. Ces lames doivent être utilisées en tant que contrôles de procédure. **La lignée cellulaire A (MCF-7)** n'est pas amplifiée et présentera ≤ 5 signaux ou points par noyau. **La lignée cellulaire B** (SK-OV-3) est amplifiée et apparaîtra sous forme d'agrégats DAB de petite ou grande taille dans le noyau.
- La lame de la lignée cellulaire de contrôle doit être traitée avec chaque série de lames de test de la patiente et subir le même traitement que les coupes de tissu.
- Si la lame de contrôle (**lame L**) est négative pour les lignées cellulaires A et B, cela indique une erreur dans la procédure CISH.
- La lignée cellulaire de contrôle positif (B), qui permet de montrer l'amplification HER2, doit être d'abord examinée pour garantir que tous les réactifs fonctionnent correctement. La présence d'agrégats de gènes ou de > 5 signaux ou points individuels dans le noyau d'une même cellule indique une réactivité positive attendue. Si le contrôle positif ne montre pas la présence d'agrégats ou de > 5 signaux par noyau dans une majorité (> 50 %) de cellules tumorales, les résultats obtenus pour les spécimens de la patiente doivent être considérés comme erronés.
- La lignée cellulaire de contrôle négatif ou normal (A), qui permet de montrer l'absence d'amplification HER2, doit contenir ≤ 5 points dans le noyau de chaque cellule.
- Si un marquage non spécifique intervient dans le noyau de la lignée de contrôle normal (A), les résultats obtenus pour les échantillons de la patiente doivent être considérés comme erronés.
- Un marquage non spécifique se distingue généralement par sa coloration diffuse. Une coloration brune sporadique peut parfois être observée à l'extérieur du noyau dans les coupes de tissu excessivement fixés au formol. Le cas échéant, les résultats doivent être interprétés avec soin. Le marquage non spécifique ne doit pas être confondu avec des signaux CISH positifs.
- Un contrôle de tissu positif comprenant un tissu de cancer du sein utilisé pour montrer l'amplification HER2, si utilisé, doit indiquer la présence d'agrégats de gènes ou de > 5 signaux ou points individuels par noyau dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales, révélant une réactivité positive attendue. Si le contrôle positif ne montre pas la présence d'agrégats ou de > 5 signaux par noyau dans une majorité (> 50 %) de cellules tumorales, les résultats obtenus pour les échantillons de la patiente doivent être considérés comme erronés.
- Un contrôle de tissu négatif comprenant un tissu de cancer du sein utilisé pour montrer l'absence d'amplification HER2, si utilisé, doit contenir < 5 signaux par noyau dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales.
- En général, la présence de deux signaux ou points maximum dans les noyaux du tissu normal (cellules épithéliales ou stromales normales de la tumeur) du contrôle de tissu positif correspondant confirme l'absence de réaction croisée entre la sonde ainsi que les réactifs d'immunodétection et les composants ou les tissus cellulaires. Si un marquage non spécifique intervient dans le noyau de la contrepartie de tissu normal du contrôle de tissu positif, les résultats obtenus pour les échantillons de la patiente doivent être considérés comme erronés.
- Tout écart dans la manipulation des tissus et des procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur doit être validé car il peut produire des variations significatives des résultats ce qui peut nécessiter des contrôles réguliers en interne en plus de ceux effectués dans les procédures suivantes.

Interprétation

Évaluation de l'adéquation de la lame

Les points (signaux) HER2 CISH doivent être petits mais aisément discernables à l'aide d'un objectif de 20X à 40X. Les points possèderont une coloration brune sur la coloration de contraste.

Si aucun point n'apparaît sur l'échantillon, renouveler le dosage. Contacter le service d'assistance technique en composant le 1-800-955-6288 (États-Unis uniquement) pour déterminer les causes éventuelles du problème.

Aspect du signal CISH – consulter l'annexe A, « Guide d'interprétation du test HER2 CISH »
Les points HER2 CISH apparaissent sous différentes formes :

- Point unique (**figure G**). Un point unique possède un pourtour arrondi et lisse dans les cellules normales ou tumorales. Un point unique représente une seule copie du gène HER2.
- Un doublet (**figure H**). Les points apparaissent comme des « paires » et ne constituent pas de vrais petits agrégats. Si deux signaux sont situés à une distance inférieure au diamètre d'un signal, ces signaux doivent être comptabilisés comme un point unique. Le doublet résulte de la division des chromosomes, chaque signal résidant sur la paire de chromatides sœurs.[29]
- Un petit agrégat (**figure E**). Un petit agrégat est un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre de 3 à 5 fois celui d'un point unique. Un point unique provenant des cellules tumorales ou des cellules épithéliales normales de la même lame peut être utilisé comme référence.
- Un agrégat important (**figure A**). Un agrégat important est un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre 5 fois supérieur à celui d'un point unique. Un point unique provenant des cellules tumorales ou des cellules épithéliales normales de la même lame devrait être utilisé comme référence.

Grossissement	Signal CISH
10X	Les points uniques sont à peine visibles et facilement oubliés.
20X	Les points uniques sont petits mais aisément discernables.
40X	Les points uniques sont facilement identifiés.
60X ou 100X	Non requis.

Sélection des champs cible pour l'énumération du signal HER2 CISH :

- Au moyen d'objectifs de 4X à 20X, balayer l'échantillon marqué par la méthode CISH afin d'identifier les zones les plus représentatives du point de vue histopathologique de carcinome envahissant. Éviter les zones de nécrose, les signaux chevauchants liés au chevauchement des noyaux et les noyaux présentant une faible intensité de signal. Éviter les carcinomes intracanalaires (DCIS) dans les carcinomes envahissants. Évaluer l'hétérogénéité intratumorale possible du statut du gène HER2 avant l'énumération CISH.
- Si l'échantillon est homogène, choisir une zone de tissu présentant des signaux CISH puissants pour l'énumération du signal. Effectuer l'énumération du signal.
- Si l'échantillon présente une hétérogénéité intratumorale du statut du gène HER2 dans le carcinome envahissant, sélectionner les zones représentant chaque statut du gène HER2 pour l'énumération du signal. Un échantillon de tissu est hétérogène si le statut du gène HER2 (cellules amplifiées et non amplifiées) varie dans plusieurs zones du même fragment d'un cancer du sein primaire. Les cellules de chaque zone d'hétérogénéité doivent être évaluées pour déterminer le statut HER2 (amplifié ou non amplifié) prédominant dans plus de 50 % de la coupe tumorale. Effectuer l'énumération du signal de la zone dans laquelle le statut HER2 prédomine pour cette tumeur.

Énumération du signal

- Utiliser un objectif de 40X. Un objectif plus grand peut être utilisé si nécessaire, mais une immersion dans l'huile est inutile.
- Consulter **l'annexe A**, « Guide d'interprétation du test HER2 CISH ».
- Un gène HER2 individuel apparaît sous forme d'un petit point rond (**figure G**).
- Ne pas comptabiliser les noyaux chevauchants ou les zones dans lesquelles les noyaux ne sont pas visibles. Comptabiliser uniquement le signal CISH se trouvant à l'intérieur d'un noyau. Exclure les signaux sporadiques occasionnels pouvant être liés à des restes d'un débordement d'ADN HER2 suite au renouvellement des cellules de cancer, à l'extérieur du noyau.

<u>Pas d'amplification</u>

- Définie comme 1 à 5 points uniques dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales dans la zone de tissu sélectionnée.
- Il n'est pas nécessaire de comptabiliser les points dans 30 cellules. Facultatif : utiliser la fiche de **l'annexe B**, « Fiche de scores HER2 CISH » pour la numération des cellules. Rapporter les résultats sous forme de moyenne de la numération cellulaire totale des 30 cellules pour obtenir un diagnostic précis de l'absence d'amplification.

Amplification

- Définie comme :
  - > 5 points dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales dans la zone de tissu sélectionnée, ou
  - D'importants agrégats dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorale dans la zone de tissu sélectionnée, ou
  - Un mélange de points multiples et d'agrégats importants dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales dans la zone de tissu sélectionnée, ou
  - Un mélange de points multiples et de petits agrégats dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales dans la zone de tissu sélectionnée, ou
  - De petits agrégats dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales dans la zone de tissu sélectionnée.
- Pour l'ensemble des cas indiqués ci-dessus, il n'est pas nécessaire de compter les points dans 30 cellules. Facultatif : utiliser la fiche de **l'annexe B**, « Fiche de scores HER2 CISH » pour la numération des cellules. Rapporter les résultats sous forme de moyenne de la numération cellulaire totale des 30 cellules pour obtenir un diagnostic précis de l'absence d'amplification. À des fins de numération, compter un petit agrégat comme 5 points et un agrégat important comme 10 points.
  - Justification : l'affectation d'un nombre de points spécifique aux agrégats de petite et grande taille est arbitraire à des fins de quantification. Les cellules possèdent généralement deux copies de gène HER2. Les cellules pour lesquelles l'ADN a été répliqué mais qui ne se sont pas encore été divisées, possèdent 4 copies de gène. Un petit agrégat indique donc une amplification et possède un nombre minimum de 5 copies du gène. Un agrégat important, au moins équivalent au double de la taille d'un petit agrégat, possèdera un nombre minimum de 10 copies du gène.

- **Cas imprécis d'amplification ou d'absence d'amplification**

  Interpréter avec soin les échantillons qui n'appartiennent pas clairement à l'une des catégories (amplification/pas d'amplification). Ces échantillons possèdent entre 4 et 6 points dans la majorité (> 50 %) des cellules tumorales dans le champ cible. Lorsque le nombre moyen de points se situe entre 4 et 6 points après avoir effectué la numération de 30 cellules tumorales, 30 cellules supplémentaires doivent être comptées pour obtenir un total de 60 cellules.

  Si le doute persiste, refaire le test avec une lame d'échantillon frais. Reporter les résultats dans la fiche de l'**annexe B**, « Fiche de scores HER2 CISH ».

  1. Compter les points dans 30 cellules tumorales de la zone de tissu sélectionnée. Se reporter au point 4 ci-dessous si des petits agrégats sont identifiés.
  2. Additionner tous les points trouvés dans les 30 cellules et calculer la moyenne.
  3. Rapporter le résultat comme une moyenne de la numération des 60 cellules.
  4. Si un mélange de points uniques et de petits agrégats (suite à l'agrégation de plusieurs points uniques) est observé ou si seuls des petits agrégats sont identifiés :
     - Compter un petit agrégat comme 5 points.
     - Un point unique provenant des cellules tumorales ou des cellules épithéliales normales de la même lame peut être utilisé comme référence pour déterminer ce à quoi correspond un petit agrégat.
  5. Rapporter le résultat comme une moyenne de la numération des 60 cellules pour obtenir un diagnostic de l'amplification ou de l'absence d'amplification conformément aux directives d'Invitrogen.

- **Enregistrement des résultat**s

  Les résultats peuvent être reportés dans la fiche de l'annexe B, « Fiche de scores HER2 CISH ». Le rapport de statut HER2 doit être enregistré conformément aux directives d'Invitrogen, notamment pour les cas imprécis d'amplification ou d'absence d'amplification.

Récapitulatif de l'interprétation

Amplification	> 5 points, agrégats importants, mélange de points multiples et d'agrégats importants, mélange de points multiples et de petits agrégats ou petits agrégats du gène HER2 présents dans chaque noyau dans une majorité (> 50 %) des cellules tumorales de la zone de tissu sélectionnée pour l'énumération. Consulter les f**igures A, B, C, D et E** de **l'annexe A, « Guide d'interprétation du test HER2 CISH »**. Un agrégat important est un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre 5 fois supérieur à celui d'un point unique. Un point unique provenant des cellules tumorales ou des cellules épithéliales normales de la même lame doit être utilisé comme référence. Consulter la **figure A** de **l'annexe A**. Un petit agrégat est un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre de 3 à 5 fois celui d'un point unique. Un point unique provenant des cellules tumorales ou des cellules épithéliales normales de la même lame doit être utilisé comme référence. Consulter la **figure E** de **l'annexe A**.
Pas d'amplification	1 à 5 points du gène HER2 présent dans chaque noyau dans une majorité (> 50 %) des cellules tumorales de la zone de tissu sélectionnée pour l'énumération. Consulter les **figures F**, **G, et H** de **l'annexe A.** Un point unique possède un pourtour arrondi et lisse et est présent dans les cellules normales et tumorales.

Valeurs attendues

La prévalence du gène HER2 amplifié dans la population féminine générale atteinte du cancer du sein est de 18 à 30 %.[8, 9] Lors de la comparaison de l'amplification du gène HER2 à la surexpression de la protéine HER2, les études ont montré que jusqu'à 5 % des patientes atteintes d'un cancer du sein sont positives à la surexpression de la protéine au test par immunohistochimie (IHC) et négatives pour l'amplification du gène HER2.[10]

Caractéristiques de performances spécifiques

Performances cliniques

La sécurité et l'efficacité du coffret SPOT-Light® HER2 CISH ont été évaluées dans une étude comparative de trois tests : le coffret SPOT-Light® HER2 CISH, PathVysion® FISH et HercepTest™. L'étude a porté sur deux types de cas : 226 cas consécutifs et 60 cas supplémentaires. Les cas consécutifs ont été sélectionnés à partir de cancers du sein invasifs consécutifs examinés dans le cadre de la prise en charge des patientes sur deux sites d'étude (A et B). Les cas supplémentaires correspondent aux cas ayant reçu un score de 2+ par immunohistochimie (IHC) (à l'aide de l'anticorps AB8) pendant la prise en charge des patientes sur le site A.

A. <u>Cas consécutifs</u>

Le tableau suivant synthétise la répartition des résultats CISH et FISH par rapport aux scores HercepTest™. Un test était considéré acceptable si la lame marquée obtenue permettait d'effectuer une évaluation.

Tableau 1 : Résultats des techniques IHC, FISH et CISH

Expression de la protéine, HercepTest™ Score		**0**	**1**	**2**	**3**	**Total**
Cas IHC	(N)	141	19	21	40	221
	(%)[1]	63,8 %	8,6 %	9,5 %	18,1 %	100 %
Ratio du gène avec le statut HER2 par FISH						
Nombre de cas FISH acceptables[2]		140	19	21	38	218
N amplifié (%)[3]		1 (0,5)	0 (0,0)	5 (2,3)	31 (14,2)	37
N non-amplifié (%)[3]		139 (63,8)	19 (8,7)	16 (7,3)	7 (3,2)	181
Copies du gène avec le statut HER2 par CISH						
Nombre de cas CISH acceptables[2]		132	17	19	38	206
N amplifié (%)[3]		1 (0,5)	0 (0,0)	3 (1,5)	32 (15,5)	36
N non-amplifié (%)[3]		131 (63,6)	17 (8,3)	16 (7,8)	6 (2,9)	170

[1] % = N ÷ N total × 100 %

[2] Nombre de cas FISH (ou CISH) acceptables avec le score IHC correspondant.

[3] % = n ÷ Nombre total de cas FISH (ou CISH) acceptables × 100%

Tableau 2 : Concordance entre CISH et IHC

Résultats CISH	**Résultats IHC**		**Total**
	Positif (3+)	**Négatif (< 3+)**	
Amplifié	32	4	36
Non amplifié	6	164	170
Total	38	168	206

20 cas ont été signalés avec des résultats de test IHC ou CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance positive	**=**	**32/38**	**= 84,2 %**	**(95 % CI : 68,8 %, 94,0 %)**
Concordance négative	**=**	**164/168**	**= 97,6 %**	**(95 % CI : 94,0 %, 99,4 %)**
Concordance du pourcentage total	**=**	**(32+164)/206**	**= 95,1 %**	**(95 % CI : 91,3 %, 97,7 %)**

Les résultats ont montré une concordance de 95,1 % (95 % CI : 91,3 % –97,7 %), indiquant un degré d'accord élevé entre le coffret SPOT-Light® HER2 CISH et HerceptTest™.

Tableau 3 : Concordance entre CISH et FISH

Résultats CISH	Résultats FISH		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	34	0	34
Non amplifié	2	169	171
Total	36	169	205

21 cas ont été signalés avec des résultats de test FISH ou CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance positive	**=**	**34/36**	**= 94,4 %**	**(95 % CI : 81,3 %, 99,3 %)**
Concordance négative	**=**	**169/169**	**= 100,0 %**	**(95 % CI : 97,8 %, 100 %)**
Concordance du pourcentage total	**=**	**(34+169)/205**	**= 99 %**	**(95 % CI : 96,5 %, 99,9 %)**

Les résultats ont montré une concordance de 99 % (95 % CI : 96,5 %–99,9 %), indiquant un degré d'accord élevé entre le coffret SPOT-Light® HER2 CISH et le test PathVysion® HER2. Le taux de concordance indiquait donc que le test du coffret SPOT-Light® HER2 CISH a fourni des résultats équivalents au test PathVysion® HER2.

Un récapitulatif des deux cas discordants entre les tests de la sonde SPOT-Light® HER2 et PathVysion® HER2 est indiqué ci-dessous. Les données CISH et FISH sont indiquées sous forme de moyenne et d'intervalle. La colonne IHC indique le score HercepTest.™

Tableau 4 : Cas discordants entre les techniques FISH et CISH

HER2 CISH (Pos)/FISH (Nég)				HER2 CISH (Nég)/FISH (Pos)			
Nombre de sujets	**CISH**	**FISH**	**IHC**	**Nombre de sujets**	**CISH**	**FISH**	**IHC**
(2, 0,98 %)[1]							
				A-095-01	4,07 (1,00 ─10,00)	2,81 (1,67 ─ 5,00)	2+
				B-008	2,77 (2,00 ─ 4,00)	2,65 (1,00 ─ 6,00)	2+

[1] % = nombre de cas discordants divisé par le nombre total de cas acceptables utilisant les techniques FISH et CISH sur le site correspondant × 100 %

B. <u>Cas supplémentaires IHC 2+</u>

60 cas IHC 2+ supplémentaires ont été fournis par le site d'étude A et testés sur les sites d'étude A et B. Les résultats de chaque site d'étude ont montré que le test du coffret SPOT-Light® HER2 CISH a fourni des résultats équivalents à ceux obtenus avec le test PathVysion® HER2. Les résultats de la corrélation sont synthétisés dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Concordance entre les techniques CISH et FISH sur le site d'étude A avec les cas IHC 2+

Résultats CISH	Résultats FISH		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	6	0	6
Non amplifié	2	46	48
Total	8	46	54

6 cas ont été signalés comme incomplets ou incorrects

Concordance positive	**=**	**6/8**	**= 75,0 %**	**(95 % CI : 34,9 %, 96,8 %)**
Concordance négative	**=**	**46/46**	**= 100,0 %**	**(95 % CI : 92,3 %, 100,0 %)**
Concordance du pourcentage total	**=**	**(6+46)/54**	**= 96,3 %**	**(95 % CI : 87,3 %, 99,6 %)**

Tableau 6 : Concordance entre les techniques CISH et FISH sur le site d'étude B avec les cas IHC 2+

Résultats CISH	Résultats FISH		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	7	2	9
Non amplifié	2	45	47
Total	9	47	56

4 cas ont été signalés comme incomplets ou incorrects

Concordance positive	**=**	**7/9**	**= 77,8 %**	**(95 % CI : 40,0 %, 97,2 %)**
Concordance négative	**=**	**45/47**	**= 95,7 %**	**(95 % CI : 85,5 %, 99,5 %)**
Concordance du pourcentage total	**=**	**(7+45)/56**	**= 92,9 %**	**(95 % CI : 82,7 %, 98,0 %)**

Tableau 7 : Cas IHC 2+ discordants entre les techniques CISH et FISH

HER2 CISH (Pos)/FISH (Nég)				HER2 CISH (Nég)/FISH (Pos)			
Nombre de sujets	**CISH**	**FISH**	**IHC**	**Nombre de sujets**	**CISH**	**FISH**	**IHC**
Site A (2, 3,70 %)[1]							
				S-156-01	2,77 (1,00 – 5,00)	2,48 (0,50 – 5,00)	2+
				S-173-01	3,67 (1,00 – 7,00)	2,34 (0,50 – 8,00)	2+
Site B (4, 7,14 %)[1]							
S-171	5,20 (2,00 – 8,00)	1,08 (0,50 – 2,00)	3+	S-156	5,00 (1,00 – 9,00)	2,23 (1,00 – 5,00)	3+
S-178	20,00 (20,00 – 20,00)	1,25 (0,50 – 2,00)	0	S-183	4,13 (3,00 – 6,00)	2,73 (1,00 – 6,00)	0

[1] % = nombre de cas discordants divisé par le nombre total de cas acceptables utilisant les techniques FISH et CISH sur le site correspondant x 100 %

C. Cas HercepTest 2+

Tous les cas consécutifs et supplémentaires ont été testés à l'aide de la méthode HercepTest™. Les cas ayant donné des scores HercepTest™ 2+ ont été combinés et testés sur les deux sites d'étude. Les résultats de chaque site d'étude ont montré que le test du coffret SPOT-Light® HER2 CISH a fourni des résultats équivalents à ceux obtenus avec le test PathVysion® HER2. Les résultats de la corrélation sont synthétisés dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Concordance entre les techniques CISH et FISH appliquées aux cas HercepTest 2+ sur le site d'étude A

Résultats CISH	Résultats FISH		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	3	0	3
Non amplifié	4	27	31
Total	7	27	34

2 cas ont été signalés avec des résultats de test FISH ou CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance positive	=	**3/7**	**= 42,9 %**	**(95 % CI : 9,9 %, 81,6 %)**
Concordance négative	=	**27/27**	**= 100,0 %**	**(95 % CI : 87,2 %, 100,0 %)**
Concordance du pourcentage total	=	**(3+27)/34**	**= 88,2 %**	**(95 % CI : 72,6 %, 96,7 %)**

Tableau 9 : Concordance entre les techniques CISH et FISH appliquées aux cas HercepTest 2+ sur le site d'étude B

Résultats CISH	Résultats FISH		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	4	1	5
Non amplifié	1	35	36
Total	5	36	41

2 cas ont été signalés avec des résultats de test FISH ou CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance positive	=	**4/5**	**= 80,0 %**	**(95 % CI : 28,4 %, 99,5 %)**
Concordance négative	=	**35/36**	**= 97,2 %**	**(95 % CI : 85,5 %, 99,5 %)**
Concordance du pourcentage total	=	**(4 + 35)/41**	**= 95,1 %**	**(95 % CI : 83,5 %, 99,4 %)**

Tableau 10 : Cas discordants HercepTest 2+ entre les techniques CISH et FISH

HER2 CISH (Pos)/FISH (Nég)				HER2 CISH (Nég)/FISH (Pos)			
Nombre de sujets	**CISH**	**FISH**	**IHC**	**Nombre de sujets**	**CISH**	**FISH**	**IHC**
Site A (4, 11,76 %)[1]							
				A-095-01	4,07 (1,00 –10,00)	2,81 (1,67 – 5,00)	2+
				B-008-08	1,77 (1,00 – 4,00)	2,45 (1,00 – 5,00)	2+
				S-156-01	2,77 (1,00 – 5,00)	2,48 (0,50 – 5,00)	2+
				S-173-01	3,67 (1,00 – 7,00)	2,34 (0,50 – 8,00)	2+
Site B (2, 4,88 %)[1]							
A-023	5,20 (2,00 – 8,00)	1,49 (0,67 – 3,50)	2+	B-008	2,77 (2,00 – 4,00)	2,65 (1,00 – 6,00)	2+

[1] % = nombre de cas discordants divisé par le nombre total de cas acceptables utilisant les techniques FISH et CISH sur le site correspondant x 100 %

D. Cas de polysomie

Deux sites d'étude ont évalué les cas de polysomie d'après leurs pratiques cliniques institutionnelles respectives. Sur le site A, la polysomie du chromosome 17 a été définie comme la présence de ≥ 3 signaux CEP17 dans au moins 10 % des cellules tumorales, alors que sur le site B, le critère était la présence de ≥ 3 signaux CEP17 dans au moins 30 % des cellules tumorales. La fréquence des tumeurs présentant une polysomie du chromosome 17 était de 18,68 % sur le site A et de 7,91 % sur le site B. Le taux de détection de la polysomie sur le même groupe tumoral variait significativement entre les deux sites de test en raison de la différence dans la définition de la polysomie utilisée sur chaque site. Les résultats de chaque site d'étude ont montré que le test du coffret SPOT-Light® HER2 CISH a fourni des résultats équivalents à ceux obtenus avec le test PathVysion® HER2. Les résultats sont synthétisés dans les tableaux 11 et 12.

Tableau 11 : Concordance des techniques CISH et FISH avec les cas de polysomie sur le site d'étude A

Résultats CISH	Résultats FISH		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	12	0	12
Non amplifié	2	34	36
Total	14	34	48

3 cas ont été signalés avec des résultats de test FISH ou CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance positive	=	**12/14**	**= 85,7 %**	**(95 % CI : 57,2 %, 98,2 %)**
Concordance négative	=	**34/34**	**= 100,0 %**	**(95 % CI : 89,7 %, 100,0 %)**
Concordance du pourcentage total	=	**(12 + 34)/48**	**= 95,8 %**	**(95 % CI : 85,8 % , 99,5 %)**

Tableau 12 : Concordance des techniques CISH et FISH avec les cas de polysomie sur le site d'étude B

Résultats CISH	Résultats FISH		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	12	1	13
Non amplifié	0	9	9
Total	12	10	22

0 cas ont été signalés avec des résultats de test FISH ou CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance positive	=	**12/12**	**= 100,0 %**	**(95 % CI : 73,5 % , 100,0 %)**
Concordance négative	=	**9/10**	**= 90,0 %**	**(95 % CI : 55,5 % , 99,8 %)**
Concordance du pourcentage total	=	**(12 + 9)/22**	**= 95,5 %**	**(95 % CI : 77,2 % , 99,9 %)**

Tableau 13 : Cas de polysomie discordants entre les techniques CISH et FISH

HER2 CISH (Pos)/FISH (Nég)				HER2 CISH (Nég)/FISH (Pos)			
Nombre de sujets	**CISH**	**FISH**	**IHC**	**Nombre de sujets**	**CISH**	**FISH**	**IHC**
Site A (2, 4,17 %)[1]							
				A-095-01	4,07 (1,00 ─10,00)	2,81 (1,67 ─ 5,00)	2+
				S-156-01	2,77 (1,00 ─ 5,00)	2,48 (0,50 ─ 5,00)	2+
Site B (1, 4,55 %)[1]							
A-023	5,20 (2,00 ─ 8,00)	1,49 (0,67 ─ 3,50)	2+				

[1] % = nombre de cas discordants divisé par le nombre total de cas acceptables utilisant les techniques FISH et CISH sur le site correspondant x 100 %

E. Synthèse des résultats de la comparaison entre le coffret SPOT-Light® HER2 CISH et le coffret de la sonde à ADN PathVysion® HER2.

Tableau 14 : Synthèse des résultats obtenus avec le coffret SPOT-Light® HER2 CISH et le coffret de la sonde à ADN PathVysion® HER2

Type de cas	Cas consécutifs	Cas supplémentaires		Cas équivoques		Cas de polysomie	
		Site A	Site B	Site A	Site B	Site A	Site B
Nombre d'échantillons	205	54	56	34	41	48	22
% de concordance positive	94,4 %	75,0 %	77,8 %	42,9 %	80,0 %	85,7 %	100,0 %
% de concordance négative	100,0 %	100,0 %	95,7 %	100,0 %	97,2 %	100,0 %	90,0 %
% de concordance totale	99,0 %	96,3 %	92,9 %	88,2 %	95,1 %	95,8 %	95,5 %

Sensibilité analytique
La sensibilité du coffret SPOT-Light® HER2 CISH a été testée à partir de coupes de tissus cancéreux du sein FFPE présentant un statut HER2 amplifié et non amplifié, ainsi qu'à l'aide des lignées cellulaires FFPE utilisées sur des lames de contrôle. Le gène HER2 a été détecté comme un point unique dans la coupe de tissu et dans la coupe du bloc de cellules avec le gène HER2 normal. Chaque échantillon amplifié et non amplifié a présenté une contre-coloration d'intensité 3+ et une morphologie de tissu correcte.

Efficacité de l'hybridation
L'efficacité de l'hybridation a été établie en testant 2 échantillons de tissu (1 amplifié, 1 non amplifié, 10 coupes chacun) et 4 échantillons de lignées cellulaires (2 amplifiés, 2 non amplifiés). Chaque échantillon a été analysé afin de déterminer le nombre de cellules possédant des signaux HER2 parmi le nombre total de cellules analysées (100 à 300 cellules). L'efficacité de l'hybridation a été évaluée à 94,7 à 100 %. Pour le marquage CISH de 226 échantillons cliniques provenant de 3 laboratoires, le taux d'échec de chaque site était de 8,4 % (19), 1,3 % (3) et de 0,9 % (2).[28]

Spécificité analytique
Pour déterminer la spécificité, des études en métaphases ont été réalisées sur des lames préparées de manière cytogénétique, une PCR a été effectuée à l'aide d'une paire d'amorces spécifique au gène HER2 dans la sonde ADN modèle HER2 et un séquençage de l'ADN a été réalisé sur les deux extrémités des clones BAC utilisés dans la sonde ADN HER2.

La sonde SPOT-Light® HER2 CISH a montré une liaison spécifique pour le locus du gène HER2 sur la bande du chromosome 17q11.2-21. La localisation chromosomique a été définie par la technique FISH en métaphase sur des lymphocytes normaux. Le test par PCR a révélé la bande ADN voulue et le séquençage ADN a indiqué l'emplacement chromosomique correct et la couverture du gène HER2.

Limites de la procédure
La procédure SPOT-Light® HER2 CISH a été testée avec les valeurs extrêmes de chacun des paramètres suivants : épaisseur du tissu, prétraitement, dénaturation, hybridation, lavage stringent, immunodétection et contre-coloration. Aucune différence significative au niveau des résultats CISH n'a été observée dans les conditions suivantes :

Tableau 15 : Limites de la procédure

	Plages acceptables pour le paramètre du test		
Épaisseur du tissu		4 à 6 µm	
Prétraitement par la chaleur		99 à 100°C	10 à 20 min
Digestion enzymatique			4 à 14 min
Dénaturation	Thermocycleur PCR	93 à 98°C	2 à 8 min
Hybridation		30 à 39°C	10 à 18 h
Lavage stringent		60 à 78°C	2 à 8 min
Immunodétection	Conjugué polymère HRP		25v60 min
	Chromogène DAB		15 à 60 min
Coloration de contraste			3 à 30 s

Reproductibilité
Trois lots de coffrets SPOT-Light® HER2 CISH ont été testés sur 3 échantillons de tissus cancéreux du sein et sur 4 échantillons de lignées cellulaires avec différents niveaux de gène HER2. Les performances du test des 3 lots testés ont été identiques.

Reproductibilité entre les séries (d'un jour à l'autre)
L'étude a évalué la reproductibilité entre les séries CISH sur trois jours différents en utilisant des échantillons de cancer du sein avec trois types de statuts HER2 possédant 3 spécimens de chaque type. La synthèse des résultats est indiquée ci-dessous :

Tableau 16 : Reproductibilité entre les séries (d'un jour à l'autre)

Copie du gène		**Non amplifié**	**Non amplifié, polysomie**	**Amplifié**
Moyenne N =	**9**	**1,79**	**3,45**	**20,22**
Écart type	**9**	**0,05**	**0,12**	**1,72**
CV	**9**	**3 %**	**4 %**	**8 %**

Étude observateur à observateur
Trois pathologistes ont été formés à la lecture des lames préparées et colorées à l'aide du coffret SPOT-Light® HER2 CISH. Pour valider la compétence, huit lames précolorées (6 non amplifiées et 2 amplifiées) fournies par Invitrogen ont été données à chaque pathologiste. Pour les deux types de cas (avec et sans amplification), tous les échantillons (100 %) ont été interprétés avec précision.

Tableau 17 : Reproductibilité entre les observateurs

Numéro d'identification de la lame	Numéro de lame	Signal CISH, moyenne points/cellule HER2 CISH et statut du gène HER2		
		Observateur 1	Observateur 2	Observateur 3
1	Échantillon 1 (NAM)	2 points (NAM)	1-5 points (NAM)	1-2 (NAM)
2	Échantillon 2 (AM)	Agrégat important + points multiples (AM)	Agrégat important + points multiples (AM)	10 (AM)
3	Échantillon 3 (NAM)	2-5 (NAM)	1-5 (NAM)	3-5 (NAM)
4	Échantillon 4 (NAM)	2-4 (NAM)	2,8 (NAM)	3-5 (NAM)
5	Échantillon 5 (NAM)	2 (NAM)	1-5 (NAM)	1-2 (NAM)
6	Échantillon 6 (NAM)	2-5 (NAM)	1-5 (NAM)	4 (NAM)
7	Échantillon 7 (AM)	Agrégat important + points multiples (AM)	Agrégat important (AM)	Agrégat important + points multiples (AM)
8	Échantillon 8 (NAM)	2-5 (NAM)	3,4 (NAM)	4,3 (NAM)

Reproductibilité par site

L'étude de reproductibilité CISH menée site par site s'appuyait sur 226 cas consécutifs répétés sur trois sites d'étude. Les pourcentages de concordance totale pour la reproductibilité CISH utilisant le critère > 5 comme seuil de positivité étaient de 99,0 %, 98,6 % et 98,1 %, indiquant une forte reproductibilité du test avec le coffret SPOT-Light® HER2 CISH.

Tableau 18 : Reproductibilité CISH pour l'ensemble des cas consécutifs examinée par les sites A et B

Site A	Site B : résultats CISH		
Résultats CISH	Amplifié	Non amplifié	Total
Amplifié	34	0	34
Non amplifié	2	170	172
Total	36	170	206

20 cas ont été signalés avec des résultats de test CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance du pourcentage total = (34 + 170)/206 99,0 % (95 % CI : 96,5 %, 99,9 %)

Tableau 19 : Reproductibilité CISH pour l'ensemble des cas consécutifs examinée par les sites C et B

Site C	Site B : résultats CISH		
Résultats CISH	Amplifié	Non amplifié	Total
Amplifié	35	0	35
Non amplifié	3	184	187
Total	38	184	222

4 cas ont été signalés avec des résultats de test CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance du pourcentage total = (35 + 184)/222 98,6% (95% CI: 96,1%, 99,7%)

Tableau 20 : Reproductibilité CISH pour l'ensemble des cas consécutifs examinée par les sites C et A

Site C	Site A : résultats CISH		
Résultats CISH	Amplifié	Non amplifié	Total
Amplifié	32	1	33
Non amplifié	3	171	174
Total	35	172	207

19 cas ont été signalés avec des résultats de test CISH manquants ou incorrects et ne figurent pas dans le tableau.

Concordance du pourcentage total = (32 + 171)/207 98,1 % (95 % CI : 95,1 %, 99,5 %)

Études de répétabilité et de reproductibilité menées sur des coupes de tissus consécutifs et plusieurs épaisseurs de tissu

Les études de répétabilité et de reproductibilité ont été réalisées pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité du coffret SPOT-Light® HER2 CISH™ lors du test de tissus cancéreux du sein consécutifs non amplifiés et amplifiés présentant des épaisseurs variables.

Les échantillons évalués inclus dans les lames provenant de trois blocs de tissus cancéreux du sein : HER2 sans amplification (normal), HER2 avec une amplification limite et amplification HER2 (élevée). Dix échantillons par blocs de coupes consécutives possédant une épaisseur de 4 µm ont été traités et testés selon les procédures standard (modalités de contrôle) et des échantillons possédant des épaisseurs différentes (comprises entre 2 et 8 µm) provenant de chaque bloc ont subi un traitement et des tests dupliqués identiques conformément aux procédures standard. Les résultats du test sont indiqués dans les tableaux 21 à 23.

Tableau 21. Moyenne des points HER2 CISH par cellule dans des coupes consécutives de 4 µm (cancer du sein avec un statut HER2 *normal*)

	Numéro de fragment									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Moyenne de points HER2 CISH/noyau	1,8	2,0	1,9	2,0	1,6	1,7	1,7	1,6	1,7	2,0

Moyenne HER2	1,8
STD	0,16
% CV	8,9

Tableau 22. Moyenne des points HER2 CISH par cellule dans des coupes consécutives de 4 µm (cancer du sein avec *amplification limite* de la protéine HER2)

	Numéro de fragment									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Moyenne de points HER2 CISH/noyau	5,4	5,5	5,3	5,8	5,2	6,2	5,7	5,4	5,5	5,8

Moyenne HER2	5,6
STD	0,30
% CV	5,4

Tableau 23. Moyenne des points HER2 CISH par cellule dans des coupes consécutives de 4 µm (cancer du sein avec un statut HER2 *amplifié*)

	Numéro de fragment									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Moyenne de points HER2 CISH/noyau	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC

Dépannage

Problème	Cause probable	Action recommandée
Signal faible ou absent	1. Non-respect des instructions de prétraitement.	1. Vérifier que les conditions de prétraitement adéquates ont été respectées. Se reporter à la procédure.
	a) Conditions de prétraitement par la chaleur inappropriées (temps d'incubation ou température)	a) Vérifier que les conditions de prétraitement par la chaleur adéquates ont été respectées : 15 minutes à 98 à 102ºC.
	b) Conditions de prétraitement enzymatique inappropriées (temps ou température)	b) Vérifier que les conditions de prétraitement enzymatique adéquates ont été respectées (5 min recommandées ou entre 2 et 20 min). S'assurer que l'enzyme est à température ambiante (15 à 30°C) avant d'être utilisée.
	c) Épaisseur excessive de la coupe de tissu ne permettant pas d'obtenir des résultats optimum	c) Selon l'épaisseur du tissu (4 à 6 µm) et les méthodes de fixation, le temps d'incubation permettant d'obtenir un prétraitement enzymatique optimal peut être augmenté ou diminué.
	2. Conditions de dénaturation inappropriées	2. Vérifier que les conditions de dénaturation adéquates ont été respectées. Se reporter à la procédure.
	a) Température de dénaturation inappropriée	a) Vérifier que la température de dénaturation est de 95°C (plage comprise entre 95 et 98°C) et de 90°C (plage comprise entre 85 et 90°C) pour le thermocycleur PCR et le bloc chauffant.
	b) Temps de dénaturation inapproprié	b) Vérifier que le temps de dénaturation est de 5 min pour le thermocycleur PCR.
	3. Conditions de lavage stringent incorrectes	3. Vérifier que les conditions de lavage stringent appropriées ont été respectées. Se reporter à la procédure.
	a) Température de lavage stringent inappropriée (supérieure à 80ºC)	a) Vérifier que le lavage stringent a été effectué à 70°C. Il est recommandé d'utiliser un thermomètre étalonné pour vérifier la température.
	b) Temps d'incubation du lavage stringent inapproprié	b) Vérifier que le temps d'incubation du lavage stringent est approprié (5 min)
	4. Température de stockage ou de transport excessive	4. Vérifier les conditions de conservation. Le coffret SPOT-Light® HER2 CISH doit être stocké entre 2 et 8°C. Conserver le réactif J à température ambiante (entre 15 et 30°C).

Morphologie de tissu médiocre	1. Conditions de prétraitement par la chaleur inappropriées (temps d'incubation ou température)	1. Vérifier que les conditions de prétraitement adéquates ont été respectées.
	2. Conditions de prétraitement enzymatique inappropriées (temps ou température)	2. Vérifier que les conditions de digestion enzymatique appropriées ont été respectées. Remarque : pour la plupart des tissus mammaires, une digestion enzymatique de 5 min à température ambiante (entre 15 et 30°C) est optimale. Selon l'épaisseur du tissu et le temps de fixation, augmenter ou diminuer le temps d'incubation pour obtenir une digestion optimale.
	3. Conditions de dénaturation inappropriées (temps ou température).	3. Vérifier que les conditions de prétraitement adéquates ont été respectées. Se reporter à la procédure.
	4. Le retrait de la lamelle a provoqué des dommages physiques au niveau du tissu	4. Ne pas appuyer sur la lamelle. Pré-humidifier les lames dans du tampon SSC à température ambiante (entre 15 et 30°C) pendant 2 à 3 min ou jusqu'à ce que la lamelle se détache facilement.
	5. Séchage du tissu pendant la procédure CISH	5. Sauf indication contraire, ne pas laisser le tissu sécher pendant la procédure CISH.
	6. Épaisseur de tissu inappropriée	6. Vérifier que le tissu possède une épaisseur de 4 à 6 µm.
	7. Temps de fixation inapproprié	7. Vérifier que le tissu est fixé pendant 6 à 48 heures.
	8. Fixateur inapproprié	8. Vérifier que le tissu est fixé dans du formol tamponné neutre à 10 %.
Coloration de fond	1. Température de lavage stringent inappropriée (< 70°C)	1. Vérifier que la température de lavage stringent est appropriée (70°C).
	2. Incubation excessive avec le DAB	2. Vérifier que le temps d'incubation avec le DAB est de 30 min à température ambiante (15 à 30°C).
	3. Utilisation de réactifs inappropriés comme tampon de lavage	3. Le tampon de lavage (**réactifs E1 + E2**) doit être utilisé lors des étapes d'immunodétection.
Signaux apparents mais difficiles à visualiser	1. Contre-coloration à l'hématoxyline excessive	1. Vérifier que le temps de la contre-coloration du tissu est compris entre 3 et 5 secondes. En cas de doute sur le temps de contre-coloration optimal, appliquer la contre-coloration au tissu pendant 3 s., puis laver pendant 2 min à l'eau courante. Vérifier le tissu avec la contre-coloration au microscope. S'il est trop clair, appliquer la contre-coloration au tissu pendant 3 à 5 s à nouveau avant de poser la lamelle.
Zones sans signal	1. Formation de bulles d'air sous la lamelle lors de l'ajout de la sonde	1. Vérifier l'absence de bulles d'air lors de l'ajout de la sonde et de la lamelle.
	2. Volume de sonde insuffisant par rapport à la taille du tissu	2. Ajouter environ 15 µl pour un tissu recouvert d'une lamelle de 22 x 22 mm. Davantage de sonde et une lamelle plus large peuvent être nécessaires pour des tissus plus grands (utiliser 20 µl pour un tissu recouvert par une lamelle de 24 x 30 mm).

REMARQUE : si vous rencontrez un autre cas de figure ou si le problème persiste malgré l'action recommandée, contacter le service d'assistance technique en composant le 1-800-955-6288 (États-Unis uniquement) ou envoyez un e-mail à techsupport@invitrogen.com.

BIBLIOGRAPHIE

1. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. *Science* 229(4717):974-976, 1985.
2. Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, et al. *Science* 229:976-978, 1985.
3. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, et al. *PNAS* 82(19):6497-6501, 1985.
4. Ross JS, Fletcher JA. *Am J Clin Pathol* 112:S53-S67, 1999.
5. Shak S. *Semin Oncol* 4 (Suppl 12):71-77, 1999.
6. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. *J Clin Oncol* 17:2639-2648, 1999.
7. Ross JS, et al. *The Oncologist* 8: 307-325, 2003.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. *Science* 235:177-82, 1987.
9. Slamon DJ, et al. *Science* 244-707-12, 1989.
10. Pauletti G, et al. *J Clin Oncol* 18(21):3651-3664, 2000.
11. Herceptin (trastuzumab) package insert, Genentech, South San Francisco, CA, www.fda.gov, 2004
12. Heikki Joensuu, et al. *N Engl J Med* 354(8):809-820, 2006
13. Nicols DW, et al. *Ann Clin Laboratory Sci*, 32(1),2002.
14. Bhargava R, et. al. *Am J Clin Path* 123:237-243. 2005.
15. Gong Y, et. al. *Mod Path* 18(8):1015-21, 2005.
16. Zhao J, Wu R, Au A, et al. *Mod Pathol* 15(6):657-665, 2002.
17. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. *Anticancer Res* 24(4):2401-6, 2004.
18. Wixom CR, et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12(3): 248-251, 2004.
19. Diaz LK, et al. *J Histochem Cytochem* 52(4): 501-507, 2004.
20. van de Vijver M, et al. Chromogenic *in-situ* hybridization (CISH) compared with FISH and IHC for detection of HER2 gene amplification: An international validation ring study. 26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2003.
21. Arnould L, et al. *Br J Cancer* 88:1587-91, 2003.
22. Gupta D, et al. *Am J Clin Pathol* 119:381-87, 2003.
23. Loring P, et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13(2):194-200, 2005.
24. Rueschoff J, et al. HER2 status assessment by chromogenic *in situ* hybridization (CISH) demonstrates high sensitivity for predicting response to Herceptin. 27th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2004.
25. Wolff AC, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 131:18-43, 2007.
26. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St Louis: CV Mosby Company, 1980.
27. 24. Kiernan, JA. Histological and histochemical methods: theory and practice. New York: Pergamon Press, 1981.
28. Data on file, PMA application & USCAP 2008 Annual Meeting poster presentations, numbers 138, 139, & 140.
29. Cooper K, et al. *J Clin Pathol* 44:406-409, 1991.

MARQUES DE COMMERCE

Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™ et SPT™ sont des marques de commerce d'Invitrogen Corporation. SPOT-Light® et Zymed® sont des marques déposées d'Invitrogen Corporation. Herceptin® est une marque déposée de Genentech, Inc. HercepTest™ est une marque de commerce de Genentech, Inc. PathVysion® est une marque déposée d'Abbott Molecular, Inc.

Invitrogen Corporation
542 Flynn Road
Camarillo • CA 93012
1-800-955-6288
Pour tout problème technique, écrire à techsupport@invitrogen.com
Pour obtenir des informations générales sur le coffret SPOT-Light® HER2 CISH, écrire à her2cish@invitrogen.com

URL : www.invitrogen.com/her2cish

Explication des symboles utilisés

REF	Référence catalogue	LOT	Numéro de lot
	Limites de température		Fabricant
Σ	Permet de réaliser <n> tests	EC REP	Représentant agréé pour l'Union européenne
	Utiliser avant	IVD	Diagnostic *in vitro*
	Se reporter aux instructions		Se reporter aux documents d'accompagnement

EC REP pour IVDD 98/79/EC : Invitrogen Ltd., Inchinnan Business Park, 3 Fountain Drive, Paisley, PA4 9RF, Royaume-Uni

Copyright © Invitrogen Corporation. 16 juillet 2008

Annexe A :
Guide d'interprétation du test HER2 CISH

Amplification du gène HER2

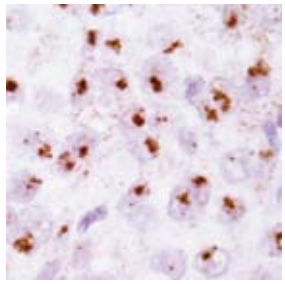
Amplification

Amplification élevée : > 10 points, agrégats importants ou un mélange de points multiples et d'agrégats importants du gène HER2 présent dans le noyau de > 50 % des cellules cancéreuses. Se reporter aux figures A, B et C.

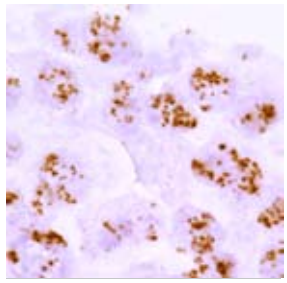
Un agrégat important est un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre 5 fois supérieur à celui d'un point unique. Un point unique provenant des cellules tumorales ou des cellules épithéliales normales de la même lame peut être utilisé comme référence. Se reporter à la figure A.

Amplification faible : > 5 points à 10 points, petits agrégats ou un mélange de points multiples et de petits agrégats du gène HER2 présent dans le noyau de > 50 % des cellules cancéreuses. Se reporter aux figures D et E.

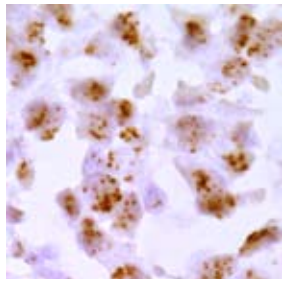
Un petit agrégat est un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre 3 à 5 fois plus grand que celui d'un point unique. Un point unique provenant des cellules tumorales ou des cellules épithéliales normales de la même lame peut être utilisé comme référence. Se reporter à la figure E.



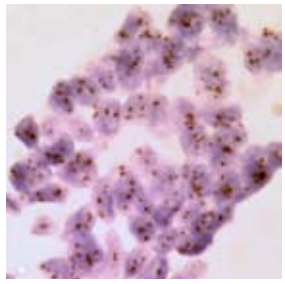
A. Agrégats importants.



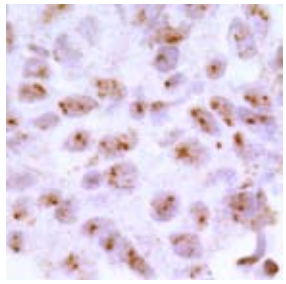
B. Points multiples (> 10 points).



C. Agrégats importants et points multiples.



D. > 5 à 10 points.



E. Petits agrégats.

invitrogen™

Pas d'amplification du gène HER2

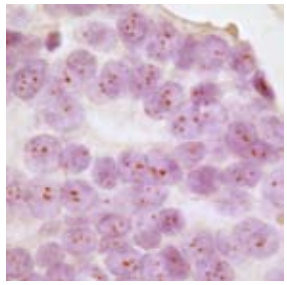
Pas d'amplification

Polysomie : 3 à 5 points du gène HER2 sont présents dans chaque noyau de > 50 % des cellules cancéreuses. Se reporter à la figure F.
Un point unique possède un pourtour arrondi et lisse dans les cellules normales ou tumorales. Se reporter à la figure F.

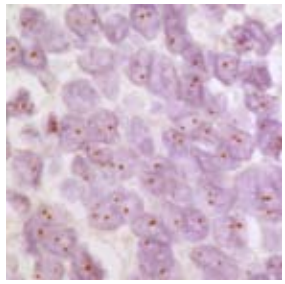
Diploïdie : 1 à 2 points du gène HER2 présents dans chaque noyau de > 50 % des cellules cancéreuses. Se reporter à la figure G.
Un point unique possède un pourtour arrondi et lisse dans les cellules normales ou tumorales. Se reporter à la figure G.

Doublet

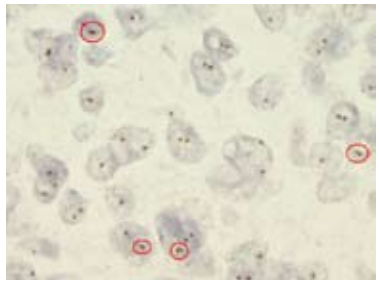
Si deux signaux sont situés à une distance inférieure au diamètre d'un signal, ces signaux doivent être comptabilisés comme un point unique. Les doublets apparaissent sous forme de paires et ne constituent pas de véritables petits agrégats. Se reporter à la figure H.



F. Polysomie : 3 à 5 points.



G. Diploïdie : 1 à 2 points.



H. Doublet = 1 point. Image gracieusement fournie par le Dr. Adrienne Morey.

©2008 Invitrogen Corporation. Tous droits réservés. Ces produits peuvent être couverts par une ou plusieurs licences à usage limité (consulter le catalogue d'Invitrogen ou au site www.invitrogen.com). En utilisant ces produits, vous acceptez les termes et les conditions de l'ensemble des licences à usage limité applicables. Ne convient pas à une utilisation à des fins de diagnostic ou thérapeutiques chez l'homme ou l'animal, sauf indication contraire. **O-079226-r1 0808**

Annexe B : Fiche de scores HER2 CISH

Coffret SPOT-Light® HER2 CISH, référence catalogue 84-0150

Numéro d'identification du registre de la série de marquage: _____

Numéro de lot du coffret SPOT-Light® HER2 CISH (84-0150): _____

Numéro d'identification de l'échantillon: _____

Résultats CISH (indiquer le nombre de signaux HER2 pour chaque cellule évaluée):

Tableau 1. Résultats CISH

Cellule n°	Points ou agrégats HER2	Cellule n°	Points ou agrégats HER2	Cellule n°	Points ou agrégats HER2
1		11		21	
2		12		22	
3		13		23	
4		14		24	
5		15		25	
6		16		26	
7		17		27	
8		18		28	
9		19		29	
10		20		30	

Remarque : pour les agrégats. veuillez fournir l'estimation la plus précise des points/copies du gène (petit agrégat = 5 points, agrégat important = 10 points).

Somme des points dans 30 cellules _____

Moyenne des points dans 30 cellules _____

Si la moyenne se situe entre 4 et 6 points, compter les points dans 30 cellules supplémentaires afin d'obtenir un total de 60 cellules et indiquer les résultats dans le tableau 2. Si la moyenne est < 4 ou > 6, il n'est pas nécessaire de compter 30 cellules supplémentaires. L'échantillon peut être consigné sous forme d'amplification ou d'absence d'amplification.

Score CISH

Instructions de consignation des scores HER2 CISH d'Invitrogen

- Pas d'amplification : 1 à 5 signaux/noyau dans les cellules tumorales
- Amplification : > 5 signaux/noyau ou agrégat de signaux amplifiés/noyau dans > 50 % des cellules tumorales

Résultat: ☐ Pas d'amplification (≤ 5) ☐ Amplification (> 5)

Signature du technicien et date: _____

Signature du pathologiste et date: _____

invitrogen™

Tableau 2 (résultats CISH). Indiquer le nombre de points présents dans le deuxième ensemble de 30 cellules, si nécessaire:

Cellule n°	Points ou agrégats HER2	Cellule n°	Points ou agrégats HER2	Cellule n°	Points ou agrégats HER2
1		11		21	
2		12		22	
3		13		23	
4		14		24	
5		15		25	
6		16		26	
7		17		27	
8		18		28	
9		19		29	
10		20		30	

Somme des points dans les cellules 31 à 60 _____

Somme des points dans les cellules 1 à 30 _____

Moyenne des points dans 60 cellules _____

Score CISH

Instructions de consignation des scores HER2 CISH d'Invitrogen

- Pas d'amplification : 1 à 5 signaux/noyau dans les cellules tumorales
- Amplification : > 5 signaux/noyau ou agrégat de signaux amplifiés/noyau dans > 50 % des cellules tumorales

Résultat: ☐ Pas d'amplification (≤ 5) ☐ Amplification (> 5)

Signature du technicien et date: _____

Signature du pathologiste et date: _____

©2008 Invitrogen Corporation. Tous droits réservés. Ces produits peuvent être couverts par une ou plusieurs licences à usage limité (consulter le catalogue d'Invitrogen ou au site www.invitrogen.com). En utilisant ces produits, vous acceptez les termes et les conditions de l'ensemble des licences à usage limité applicables. Ne convient pas à une utilisation à des fins de diagnostic ou thérapeutiques chez l'homme ou l'animal, sauf indication contraire. **O-079226-r1 0808**